

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ORIUNDAS DO LEITE HUMANO

JULIANA CARUSI¹; FABIANA K. H. S. TRENTTO²; IZILDINHA MORENO³

Nº 10231

RESUMO

O leite humano possui bactérias comensais de diferentes grupos. Destes, *Lactobacillus* e Bifidobacterias são os mais estudados, e algumas espécies são comercialmente empregadas em produtos probióticos. Além de atuar na defesa do intestino, os probióticos devem apresentar certas características fisiológicas, como por exemplo a resistência à antibióticos, sobrevivência às condições ácidas e a presença de sais biliares no intestino delgado, e tecnológicas. A busca por essas bactérias a partir do leite materno, amplia o nicho de obtenção das cepas potencialmente probióticas.

Foram isoladas 800 colônias de amostras de leite humano. Os meios e condições de cultivos foram selecionados de acordo com os grupos de interesse. O procedimento de isolamento foi modificado de modo a detectar também a inibição de *Micrococcus luteus* e *Listeria innocua*. Colônias apresentando halos de inibição destes indicadores foram isoladas e confirmadas como bactérias lácticas. Avaliou-se produção de bacteriocinas além das propriedades probióticas (inibição de patógenos, tolerância a baixos valores de pH, tolerância aos sais biliares, sensibilidade a antibióticos e capacidade de adesão).

Ao final do experimento conclui-se que o leite humano é fonte de microrganismos que possuem potencial probiótico. A bactéria láctica produtora de bacteriocina isolada apresentou ação antagônica frente à *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis*; Além disso, manteve-se viável após exposição a pH 3,0 durante 1 hora e também após 4 horas de permanência em sais biliares na concentração de 0,3%. Verificou-se ainda que esta cepa apresentou resistência aos antibióticos Clindamicina, Tetraciclina e Gentamicina e finalmente, capacidade de adesão.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências dos Alimentos, ESALQ/USP, Campinas-SP, ✉ julianacarusi@gmail.com

2. Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

ABSTRACT

The human milk has symbiotic bacterias of several groups. Into this group, *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* are the most searched microorganisms, which have some commercial strains used in probiotics products. Moreover, their action in the intestine safety, the probiotics must have some physiological characteristics, such as the resistant to antibiotics, surviving in acid conditions and in the presence of bile salts in the small intestine, and technological. The search for these bacterias using human milk increases the possibilities of probiotics bacterias obtainment. 800 colonies were isolated from human milk samples. The mediums of culture and conditions of cultivation were selected according to the groups of interesting. The procedure of isolation was modified to detected, also, the inhibition by *Micrococcus luteus* and *Listeria innocua*. The colonies in which were verified halos of inhibition by this indicative microorganisms were isolated and confirmed as lactic acid bacterias. It was evaluated the capacity of bacteriocin production and the probiotics properties (pathogenic and spoilage bacterias growth inhibition, tolerance to acid pH and bile salts, antibiotics sensibility and adhesion capacity). In the end of the experiment, we can conclude that the human milk is a source of microorganisms with probiotic potential. The bacteriocin-producing by the acid lactic bacteria isolated presented action against *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. Furthermore, it had the viability maintained after exposition to pH 3 during 1 and 4 hours of permanence in 0,3% of bile salts. It was verified that the strain was resistant when exposed to the antibiotics Clindamycin, Tetracycline and Gentamycin, and also it presented adhesion capacity.

INTRODUÇÃO

O leite é um líquido branco, opaco, resultante da ordenha de fêmeas de mamíferos no período de lactação, servindo exclusivamente como alimento (OLIVEIRA, 1986).

Dentre as bactérias presentes no leite humano estão *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsciela*, *Enterobacter*, *Serratia* (SERAFINI et al., 2003) e bactérias do ácido láctico (BAL). Estas correspondem a um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas com diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas. A principal função metabólica destas bactérias é produzir ácido láctico como principal produto da fermentação de açúcares (LERAYER et al., 2010).

Dentre as BAL mais exploradas estão os *Lactobacillus* e as Bifidobacterias, originando espécies para emprego em produtos probióticos. Probióticos são “culturas puras ou

mistas de microrganismos vivos que quando aplicadas aos animais ou ao homem, exercem efeitos benéficos ao hospedeiro” (HAVENAAR, 1992).

As cepas probióticas devem apresentar como características fisiológicas a resistência a antibióticos, tolerância a condições ácidas e sais biliares, e como características tecnológica a viabilidade celular no processamento e estocagem do produto e também nos procedimentos de produção de culturas comerciais (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

As BAL possuem como característica a produção de bacteriocinas – pequenas proteínas biologicamente ativas que apresentam pequeno ou amplo espectro de ação antimicrobiana contra outros microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

O presente trabalho foi desenvolvido visando obter dados sobre a microbiota do leite humano, tendo em vista a possibilidade de este ser uma fonte de bactérias probióticas.

MATERIAIS E METODOS

Foram utilizados os materiais: amostras de leite humano de nutrízes sadias, oligofrutose (Clariant) e cepas de *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Listeria innocua* UNICAMP, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 2074, *Salmonella thyphimurium* ATCC 2364, *Staphylococcus aureus* ATCC 1602, *Bacillus cereus* CTC 011, *Lactococcus lactis* CTC 204, *Lactobacillus helveticus* TECNOLAT.

Foram analisadas 8 amostras de leite materno de nutrízes em diferentes estágios de lactação, as quais foram enriquecidas com oligofrutose (2%) e plaqueadas em meio MRS pH 6,5 e MRS pH 5,4 com incubação a $37\pm1^{\circ}\text{C}/72\text{h}$ em anaerobiose (*Lactobacillus*); M17 substituindo-se a lactose por 5% de glicose, com incubação a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas em condições de aerobiose (*Lactococcus*) (Saxaelin et al, 1999); MRS ágar suplementado de acordo com Fávaro et al, 2004. com incubação anaeróbica a $37^{\circ}\pm1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas (*Bifidobacterium*) (Favaro et. al., 2004) além do plaqueamento em meio ágar lactato (*Propionibacterium*) com incubação a $32\pm1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias em condições de anaerobiose para detecção do gênero (Benjelloun et al, 2007).

As placas contendo até 100 colônias receberam uma sobrecamada de 4,5 mL de ágar MRS semi-sólido (0,75% de ágar), inoculado com 500 µl da cultura *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Listeria innocua* UNICAMP – bons indicadores da atividade inibitória por

bacteriocinas – e incubadas a 30°C de 24-48 horas para análise da formação de halos de inibição ao redor das colônias (HÉCHARD et al., 1990).

As colônias que apresentaram halos de inibição contra crescimento do microrganismo indicador foram transferidas para caldo TSB e incubadas a 30°C até crescimento por um tempo máximo de 72 horas. Após purificação em ágar MRS, as culturas isoladas foram ativadas em caldo MRS a 30°C por 16-18 horas e submetidas ao teste de antagonismo simultâneo em poços, conforme Tagg e McGiven (1971), modificado por Benkerroum et al. (1993), para confirmar a produção de bacteriocina contra os microrganismos *L. innocua* e *M. luteus*. Estes microrganismos foram inoculados a 2% em 20mL de ágar MRS suplementado com β -glicerofosfato de sódio a 2%. Os meios de cultura previamente inoculados foram vertidos sobre placas de Petri estéreis, de modo a se obter uma camada de 5mm de altura. Foram feitas perfurações de vários poços com o auxílio da boca de uma pipeta Pasteur, sendo que cada poço foi inoculado com 50 μ L de cada cultura de BLPB seguido de incubação a 37°C por 24 horas. Os meios foram analisados quanto a presença de halos.

As BLPB tiveram sua ação testada frente a cultivos ativos dos patógenos *E. coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *St. aureus* e *Salmonella thyphimurium*, além das BAL *Lc. lactis* e *Lb. helveticos* (Tecnolat), em fase estacionária de crescimento (10^8 UFC/mL). O espectro de atividade das BLPB contra gêneros e espécies de bactérias patogênicas e deteriorantes, foi utilizado como fator de seleção das BLPB para continuidade dos testes de verificação do potencial probiótico.

Para avaliar a resistência à acidez e sais biliares, reativou-se a cepa da BLPB por dois cultivos sucessivos e centrifugada a 6000rpm por 15 minutos a 4°C. O massa celular obtida foi lavada duas vezes em solução salina 0,85% e adicionada de 10 mL da mesma solução, originando uma suspensão contendo cerca de 10^9 UFCmL⁻¹.

Para o teste de resistência à acidez, 1 mL da suspensão foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de tampão fosfato salina (PBS) com pH ajustado a 2,0, 3,0 e 5,0 utilizando HCl 5 mol.L⁻¹. A solução de PBS foi preparada pela dissolução de NaCl (9 g.L⁻¹), Na₂HPO₄.2H₂O (9 g.L⁻¹) e KH₂PO₄ (1,5 g.L⁻¹) em água destilada (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). 1mL das soluções de diferentes pHs inoculadas foram submetidos à diluição em água peptonada 0,1%. A viabilidade celular foi verificada nos tempo 0 e após 1 e 3 horas de incubação a 37°C. A quantidade de BAL foi determinada por plaqueamento em profundidade em Ágar MRS com incubação a 37°C por 48 horas.

Para avaliar a tolerância à bile, 1mL da suspensão ativa foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares. Tubos contendo 9 mL de caldo MRS sem sais biliares foram inoculados com a cultura BLPB, servindo como controle para realização do teste. Os tubos controle e teste foram monitorados após 0, 2 horas, 4 e 24 horas de incubação a 37°C em Ágar MRS, com incubação das placas de MRS por 48h a 37°C (PENNACCHIA et al., 2004).

A susceptibilidade a antibióticos foi testada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se ampicilina (10 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), doxicilina (30 µg), eritromicina (5 µg), gentamicina (10 µg) e tetraciclina (30 µg). Cultivos das bactérias lácticas avaliados foram ajustados para o valor de 0,5 da escala McFarland, sendo semeados em placas com Ágar MRS. Em seguida, discos com cada antimicrobiano foram colocados sobre a superfície das placas de MRS. A resistência aos antibióticos foi avaliada pela medida do diâmetro em torno dos discos (mm) após 24 horas de incubação em temperatura de 37°C (HOSSEINI et al., 2009).

A capacidade de adesão foi feita de acordo com Hosseini et al., 2009 utilizando-se chapas de aço inoxidável (2,cm x 0,8cm x 0,5mm) tratadas com acetona, solução detergente, lavadas em água corrente e destilada. As placas secas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos. 0,5ml da cultura overnight das BLPB foi transferida para 4,5 ml de caldo MRS e uma placa de aço inoxidável. Após 24 horas de incubação a 37°C a placa foi assepticamente retirada, lavada com água peptonada estéril 1% durante 5 minutos e colocada em 5ml de água peptonada 1%, a fim de remover as bactérias pouco aderidas. As placas foram lavadas com 10 ml de água peptonada 1% estéril, colocadas dentro de um tubo de vidro contendo 6 ml de água peptonada 1% estéril e agitadas em vortex durante 3 minutos para criar uma suspensão celular de BAL aderidas à superfície da chapa. O número de células desta suspensão foi determinado em Agar MRS após incubação por 24 horas de incubação. Os resultados foram comparados com a quantidade inicial de células e expressos como a porcentagem de células aderidas para cada cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de células viáveis das culturas pesquisadas nas amostras de leite materno obtidas de nutrízes sadias estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Correlação da viabilidade de células em Leite Humano com o período de amamentação

Amostras de leite materno	Agar Lactato (log UFC. mL ⁻¹)	Ágar MRS pH 5,4 (log UFC. mL ⁻¹)	Agar MRS pH 6,5 (log UFC. mL ⁻¹)	Agar MRS suplementado (log UFC. mL ⁻¹)	Agar M17 c/ glicose (log UFC. mL ⁻¹)
A - 1 ano	4,12	< 1	2,36	1,59	2,33
B - 45 dias	8,80	6,27	6,77	6,59	6,55
C - 5 meses	4,54	1,62	4,47	3,38	< 1
D- 45 dias	7,05	5,64	6,64	6,81	6,91
E – não informado	8,22	7,43	7,79	6,51	6,23
F - 21 dias	6,98	4,00	7,09	7,89	7,03
G - 21 dias	8,34	< 1	6,67	4,56	6,55
H - 45 dias	7,05	5,22	8,27	6,91	7,03

De acordo com a tabela 1, a microbiota do leite humano varia devido a fatores como alimentação da nutriz e o estágio de lactação.

A partir de colônias isoladas a partir da amostra “H”, verificou-se sua ação contra os patógenos *M. luteus* e *L. innocua*, indicando a capacidade de produção de bacteriocinas pelas colônias isoladas. As BLPB tiveram seu espectro de ação testado para outros patógenos e deteriorantes. Os resultados são verificados na Tabela 2.

Tabela 2: Produção de substâncias antagônicas pelos cultivos ativos de bactérias oriundas de leite humano .

		Microrganismo sensível							
		B. cereus	L. innocua	L. monocytogenes	Lc. Lactis	Lb. Helveticus	St. Aureus	E. coli	Salmonella thyphimurium
Culturas suspeitas de produção de bacteriocina	1	12mm	18mm	21mm	11mm	11mm	–	–	–
	2	11mm	17mm	19mm	10mm	10mm	–	–	–
	3	11mm	16mm	20mm	9mm	10mm	–	–	–
	4	10mm	16mm	20mm	9mm	10mm	–	–	–
	5	12mm	16mm	19mm	10mm	9mm	–	–	–
	6	11mm	11mm	16mm	9mm	8mm	–	–	–
	7	8mm	16mm	19mm	10mm	11mm	–	–	–
	8	11mm	10mm	16mm	8mm	–	–	–	–
	9	11mm	15mm	21mm	11mm	10mm	–	–	–
	10	12mm	17mm	20mm	11mm	11mm	–	–	–

- Ausência de halos.

No teste realizado de antagonismo simultâneo em poços, a maioria das cepas de BAL foi capaz de inibir o crescimento de alguns desses microrganismos utilizados como sensíveis, verificando-se a inibição de *B. cereus*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Lc. Lactis* por todas as BLPB testadas. Contra *Lb. helveticus*, apenas a cultura de número 8 apresentou-se incapaz de inibir o crescimento desta cepa deteriorante. Não ocorreu atividade antimicrobiana sobre as cepas de *St. aureus*, *E. coli* e *Salmonella thyphimurium*.

As diferentes dimensões dos halos produzidos contra os microrganismos sensíveis permitem concluir que existem diferenças entre as culturas de interesse testadas quanto à ação antimicrobiana. A partir deste teste verificou-se que dentre BLPB testadas, a que apresentou o melhor desempenho frente às cepas sensíveis foi a BLPB de número 9 (BLPB 9).

Para os teste de resistência à acidez e sais biliares partiu-se da cultura ativa de BLPB 9 cuja viabilidade celular era $9,75 \log \text{ mL}^{-1}$. Para o teste de resistência a acidez, verifica-se que a exposição da BLPB a pH 2,0 por 1 hora, apresenta decréscimo da viabilidade em 8,06 ciclos logarítmicos, sendo inativada após 3 horas. Ao ser exposta a pH 3,0 por 1 hora, observa-se decréscimo de 4,60 $\log \text{ UFC mL}^{-1}$. Após 3 horas de exposição a pH 3,0, observa-se inativação da BLPB 9. Em pH 5,0 (condição de controle) verifica-se a manutenção da viabilidade celular durante todo o período analisado. Os resultados são verificados na Fig. 1.

Segundo Bernadeuau, 2001, para que uma bactéria seja probiótica deve resistir pelo tempo de 90 minutos em pH 3,0, simulando a passagem pelo estômago (BERNADEAU, 2001).

Analisando-se os resultados obtidos, infere-se que os pHs 2,0 e 3,0 interferem no crescimento da BLPB 9, sendo impróprios para a multiplicação celular desta cepa.

De acordo com os resultados obtidos no teste de tolerância a sais biliares, a BLPB 9 exposta a 0,3% de sais biliares pelo período de 2 e 4 horas, apresenta população microbiana próxima à concentração inicial, assemelhando-se ao observado na situação controle (ausência de sais biliares). A inativação da BLPB pela concentração de 0,3% de sais biliares foi verificada após 24 horas de incubação. A fig. 2 representa a tolerância à exposição a sais biliares pela BLPB 9.

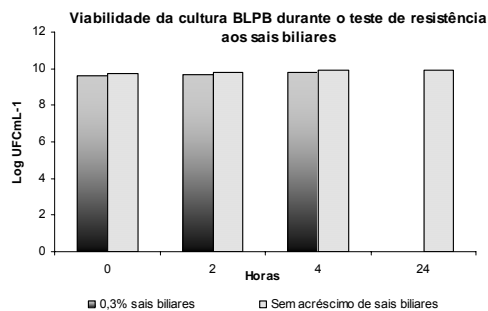
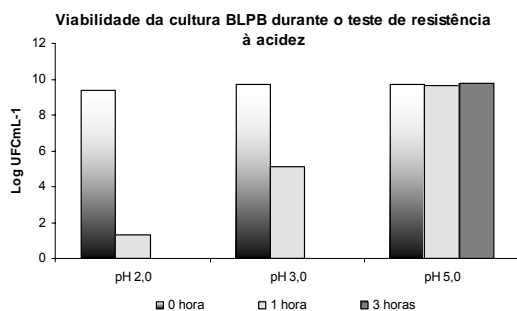


Fig. 1: Resistência da BLPB 9 a acidez

Fig. 2: Resistência da BLPB 9 a sais biliares

Em relação à resistência aos sais biliares, a BLPB 9 sobrevive à concentração média de bile encontrada no trato gastrointestinal humano. Essa resistência está relacionada com a capacidade que certas espécies de microrganismos possuem em reduzir o efeito desse detergente, por produzirem enzimas capazes de hidrolisar os sais biliares (ERKKILÄ, PETÄJÄ, 2000).

Quanto à resistência a antibióticos, observa-se na tabela 3 o diâmetro dos halos promovidos pela inibição da BLPB 9 (Tabela 3) pelos antibióticos testados. Baseando-se na tabela NCCLS, 2003, pode-se afirmar que a cepa em questão resiste à ação inibitória dos antibióticos Clindamicina, Eritromicina e Gentamicina, não sendo verificada a mesma resistência para os demais antibióticos de uso clínico testados.

Tabela 3: Susceptibilidade da cepa BLPB 9 a antibióticos de uso clínico.

Antibiótico	Diâmetro dos halos em milímetro (duplicata)*		Valores de referência (NCCLS 2003)	
	1	2	Sensibilidade	Resistência
1 –Tetraciclina	30mm (S)	31mm (S)	≥19.0	<17.0
2 –Ampicilina	25 mm (S)	26 mm (S)	≥19.0	<14.0
3 –Clindamicina	- (R)	- (R)	≥15.0	<15.0
4 –Cloranfenicol	25 mm (S)	25 mm (S)	≥23.0	<19.0
5 –Doxicilina	30 mm (S)	31 mm (S)	≥19.0	<17.0
6 –Eritromicina	15 mm (R)	16 mm (R)	≥22.0	<17.0
7 –Gentamicina	- (R)	- (R)	≥10.0	-

- Ausência de halo; (S) sensibilidade da BLPB 9 a antibióticos; (R) resistência da BLPB 9 a antibióticos

Além da capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal, a adesão nas células do epitélio intestinal para a colonização e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são importantes características para a seleção de cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA et al, 2004).

O teste permitiu verificar a capacidade da BLPB 9 de aderir a uma superfície visto que a quantidade de células retidas foi de 27% em relação à concentração inicial.

CONCLUSÃO

O leite humano é fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas com potencial probiótico. Contudo, há necessidade da realização dos testes de verificação do potencial probiótico nas demais cepas isoladas neste trabalho.

A BLPB 9, possui ação antagônica frente a *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis*; resiste a pH 3,0 durante 1 hora de exposição; mantêm-se viável por 4 horas de permanência em sais biliares na concentração de 0,3% e aderência de 27% em relação às células iniciais à superfície aderida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENJELLOUN, H., RAVELONA, M.R., LEBEAULT, J.M. Characterization of Growth and Metabolism of Commercial Strains of propionic Acid Bacteria by Pressure Measurement. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v.7, n.2, p. 143-148, 2007.

BERNADEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. In: REDONDO, N. C. **Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. ARARAQUARA; Tese de mestrado, 2008. 109p.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

FÁVARO; TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Stability of Free and Immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in Acidified Milk and of Immobilized *B. Lactis* in Yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 35, p. 151-156, 2004.

HAVENAAR, R.; BRINK, T & HUIS IN'T VELDT JHJ. In FULLER R. ed. Probiotics: **The Scientific Basis**. London: Champmann and Hall 209-224, 1992.

HECHARD, Y.; DHERBOMEZ, M.; CENATIEMPO, Y.; LETELLIER, F. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p. 185–188, 1990.

HOSSEINI, S. V.; ARLINDO, S.; BÖHME, C.; FERNÁNDEZ, No; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**: 1-12, 2009.

LERAYER, A.L.S.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; VIALTA, A. Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, M.N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**, São Paulo: Atheneu, cap. 4, p. 125-186, 2009.

OLIVEIRA, J.S. Queijo: fundamentos tecnológicos. **Ciência e Tecnologia**, 2ed., con. e editora UNICAMP, Campinas, 146p., 1986.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDEN, R.; RENIERO, R.; MATTILASANDHOLN, T. The techonology of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.** Vol. 10, p. 387 – 392. 1999

SERAFINI, A.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RDRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBE, T.F.N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Saúde pública**, Goiânia, v.37, n. 6, p. 775-779, dez. 2003.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, Melbourne, v.18, p.714-728, 2008.